

VU Research Portal

Arming the melanoma sentinel lymph node against metastatic spread

van den Hout, M.F.C.M.

2020

document version

Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link to publication in VU Research Portal](#)

citation for published version (APA)

van den Hout, M. F. C. M. (2020). *Arming the melanoma sentinel lymph node against metastatic spread: Translational studies on early adjuvant therapy of melanoma by intradermal administration of dendritic cell targeting agents CpG-B and GM-CSF*. [PhD-Thesis - Research and graduation internal, Vrije Universiteit Amsterdam].

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

E-mail address:

vuresearchportal.ub@vu.nl

Nederlandse samenvatting

Het doel van dit proefschrift is het onderzoeken van de therapeutische mogelijkheden van locoregionale immuunmodulatie bij vroeg stadium melanoom patiënten. Dit zijn patiënten die klinisch enkel gelokaliseerde ziekte hebben (stadium I en II melanoom). Ondanks het feit dat deze patiënten een relatief gunstige prognose hebben, hebben zij toch een reële kans op ziekterecidief of metastasen. Momenteel bestaat er echter geen adjuvante therapie voor deze grote groep patiënten die de kans op recidivering of metastasen kan verkleinen. Omdat deze groep zo groot is (>80% van alle melanoom patiënten) en de laatste tientallen jaren sterk is toegenomen, maken zij nu al bijna de helft uit van alle mensen die uiteindelijk sterven aan de gevolgen van melanoom. De ontwikkeling van een effectieve adjuvante therapie is dus dringend gewenst. Voorwaarde is wel dat de toxiciteit van een adjuvante therapie tot een minimum beperkt blijft aangezien de grote meerderheid van deze vroeg stadium melanoom patiënten een uitstekende prognose heeft. Vandaar dat systemische 'checkpoint inhibitors' zoals nu voor stadium III en IV melanoom gegeven worden, niet in aanmerking komen.

In dit proefschrift wordt het effect van zowel afzonderlijke als gecombineerde intradermale injecties met immuunstimulantia GM-CSF en CpG-B onderzocht. Deze injecties worden gegeven op de plaats waar het primaire melanoom geëxcideerd is. Met deze gerichte, lokale injecties proberen we het locoregionale immuunsysteem dusdanig te stimuleren dat er een effectieve antitumor respons ontstaat zonder ernstige bijwerkingen.

GM-CSF is een cytokine waarvan bekend is dat het dendritische cellen (DCs) kan rekruteren en activeren. DCs hebben een zeer belangrijke en centrale rol in de immuunrespons tegen kanker: zij kunnen tumorantigenen opnemen en verwerken en uiteindelijk presenteren aan T-cellen in lymfklieren nadat zij hierheen zijn gemigreerd via de lymfbanen. Daarbij activeren zij CD8⁺ T-cellen, die op hun beurt tumorcellen kunnen herkennen en doden nadat zij via de bloedbaan naar de tumor

zijn gemigreerd. CpG-B is een kunstmatig ongemethyleerd oligodeoxynucleotide. Ongemethyleerde oligodeoxynucleotiden komen in de natuur voor in bacteriën en virussen. Door het lichaam worden deze 'vreemde' oligodeoxynucleotiden als pathogeen herkend via 'Toll-like receptoren' (TLRs). CpG-B bindt via TLR9 aan plasmacytoïde DCs (pDCs), die hierdoor geactiveerd raken en grote hoeveelheden interferon-alpha ($\text{IFN}\alpha$) gaan secreteren. $\text{IFN}\alpha$ stimuleert andere immuuncellen zoals conventionele (myeloïde) DC subgroepen (cDC) en 'Natural Killer' (NK)-cellen waardoor er een effectieve immuunrespons kan optreden tegen de ziekteverwekker.

Om te onderzoeken wat de effecten van GM-CSF en CpG-B zijn op het immuunsysteem van vroeg stadium melanoom patiënten hebben we gebruik gemaakt van de schildwachtklier (SWK) procedure. Dit is een diagnostische procedure die verricht wordt bij melanoom patiënten om de SWK te onderzoeken op metastasen, en is belangrijk voor de stadiëring en prognose van melanoom patiënten. De SWK is de lymfklier waarop het melanoom als eerste draineert en daardoor ook de plaats waar het eerst lymfkliermetastasen op zullen treden. Om de immuuncellen uit de SWK te kunnen onderzoeken ontwikkelden we een techniek waarmee we deze cellen uit de SWK konden 'schrapen' zonder dat verder onderzoek op (micro)metastasen in het gedrang komt.

Deze immuuncellen, waaronder DCs, T-cellen en NK-cellen onderzochten we door middel van onder andere flow-cytometrie, een techniek waarmee we de expressie van multiële maturatie, activatie en suppressieve markers kunnen bepalen. Ook onderzochten we de eventuele aanwezigheid van melanoom-specifieke CD8^+ T-cellen en de suppressieve activiteit van regulatoire T-cellen (Tregs) in de SWK en het perifere bloed na in vitro expansie van T-cellen. Door buiten deze klinische fase 2 studies ook SWK van andere vroeg stadium melanoom patiënten op dezelfde wijze te onderzoeken en de resultaten te combineren met die van de placebo groepen uit de fase 2 studies konden we behalve de effecten van GM-CSF en CpG-B ook de effecten van het melanoom op het locoregionale

immuunsysteem onderzoeken. Ook stelde dit werk ons in staat om verschillende DC subgroepen uit de SWK fenotypisch en functioneel te karakteriseren en via bloedonderzoek bij dezelfde patiënten verbanden te leggen met systemische DC subgroepen en andere immuuncellen. Ten slotte deden we lange termijn follow-up van alle patienten uit de klinische fase 2 studies en keken we naar verschillen in ziektevrije overleving tussen de met CpG ± GM-CSF behandelde patiënten en de placebo groep.

In Hoofdstuk 1 wordt een algemene inleiding gegeven waarbij de historische achtergrond van het melanoom onderzoek wordt geschetst, de epidemiologie en stadiëring van melanomen kort worden besproken, en enkele opmerkingen over de etiologie en genetica van melanoom worden gemaakt. Zowel nieuwe als oude geaccepteerde behandelmethoden voor melanoom worden aangestipt met een nadruk op de recente doorbraak van immuuntherapie. Vervolgens wordt zowel de historie als de huidige rol van de SWK binnen zowel de melanoom diagnostiek als het wetenschappelijk onderzoek toegelicht. Het laatste deel van Hoofdstuk 1 behandelt de verzamelde kennis over de complexe interactie tussen het melanoom en het immuunsysteem en schetst met behulp van deze inzichten de mogelijkheden om therapeutisch gebruik te maken van deze wisselwerking.

In Hoofdstuk 2 wordt een fenotypische en functionele karakterisering van vier cDC subgroepen uit de SWK van melanoom patiënten gepresenteerd. Twee CD1a⁺ vanuit de huid gemigreerde cDC subgroepen (Langerhanscellen (LC) en dermale dendritische cellen (DDC)) worden onderscheiden, alsmede twee CD1a⁻ CD11c⁺BDCA3⁺ cDC subgroepen, die waarschijnlijk vanuit het bloed naar de SWK zijn gemigreerd. Ondanks dat de vanuit de huid gemigreerde CD1a⁺ cDC subgroepen fenotypisch meer matuur waren, bleken zij slechter in het activeren van T-cellen dan de CD1a⁻CD11c⁺BDCA3⁺ cDC subgroepen. Deze studie, de eerste die humane DCs uit de lymfklieren functioneel karakteriseert, biedt aanknopingspunten voor het ontwikkelen van op humane DCs gebaseerde immuuntherapieën.

Als addendum bij Hoofdstuk 2, laat Hoofdstuk 2.1 een reactie zien op een 'letter' van Gerlini et al. naar de editor van *Blood*, waarin gesteld wordt dat LCs in de SWK van melanoom patiënten immatuur zijn, in tegenstelling tot de data die we presenteren in Hoofdstuk 2. Als reactie daarop laten we zien dat dit verschil te verklaren is door de verschillen tussen de patiëntengroepen in beide studies: zowel de Breslow dikte (invasiediepte van het primaire melanoom) als het tijdsinterval tussen de melanoomexcisie en SWK procedure hebben een belangrijke invloed op de maturatie status van LCs in de SWK van melanoom patiënten.

Hoofdstuk 3 bouwt voort op deze bevindingen. Hierin onderzoeken we de immuunsuppressieve effecten van het melanoom op het regionale immuunsysteem door zowel de maturatie als activatiestatus van verschillende DC subgroepen in de SWK te onderzoeken in relatie tot het ziektestadium (melanoom stadia 1 t/m 3). Daarnaast worden de effecten van de verschillende melanoom stadia op het T-cel compartiment in de SWK beschreven. Bij stadium 1 en 2 melanoom blijkt de Breslow dikte significant en negatief te correleren met de maturatie en activatie status van de CD1a⁺ DC subgroepen: dikkere melanomen onderdrukken deze subgroepen sterker. De in de SWK aanwezige en uit het bloed afkomstige CD1a⁻ DC subgroepen worden echter pas onderdrukt bij stadium 3 melanoom patiënten, en ook Tregs in de SWK nemen pas toe in dit ziektestadium. Na follow up van de patiënten uit deze studie bleek lokale recidivering van melanoom te correleren met kleinere hoeveelheden van de uit de huid gemigreerde CD1a⁺ DC subgroepen terwijl melanoom recidieven op afstand en melanoom-specifieke overleving correleerden met de maturatie status van de uit het bloed afkomstige CD1a⁻ DC subgroepen in de SWK. Deze bevindingen tonen het belang aan van zowel uit de huid (CD1a⁺) als uit het bloed (CD1a⁻) gemigreerde DC subgroepen in het ziektebeloop van melanoom patiënten, en onderbouwen het gebruik van middelen die zich richten op deze subgroepen om lokale recidieven en metastasen te voorkomen bij vroeg stadium melanoom patiënten.

In Hoofdstuk 4 wordt een klinische fase 2 studie gepresenteerd die zich zowel richt op uit de huid als uit het bloed gemigreerde DC subgroepen in de SWK van melanoom patiënten door de lokale injectie van GM-CSF en CpG. In totaal 28 klinische stadium 1 en 2 melanoom patiënten werden gerandomiseerd en ontvingen intradermale injecties op de plaats waar het primaire melanoom geëxideerd was van (1) CpG-B [CpG-groep], (2) CpG-B en GM-CSF [CpG+GM groep] of (3) een fysiologische zoutoplossing [placebo groep] 7 en 2 dagen voor de SWK procedure. De gecombineerde toediening van CpG en GM-CSF resulteerde in een toegenomen maturatie status van zowel cDC als pDC subgroepen en in een selectieve toename van CD1a⁻BDCA3⁺ cDC subgroepen in de SWK. Via *in vivo* en *in vitro* correlaties vonden we aanwijzingen dat deze CD1a⁻BDCA3⁺ cDCs afkomstig zijn uit het bloed en op een type I IFN-afhankelijke manier gemobiliseerd worden naar de SWK om vervolgens te matureren onder de gecombineerde invloed van CpG en GM-CSF. De toename van deze CD1a⁻BDCA3⁺ cDCs in de SWK bleek te correleren met een toegenomen capaciteit voor kruispresentatie, een manier om tumor antigenen direct te presenteren aan tumor specifieke CD8⁺ T-cellen, die essentieel is voor een effectieve anti- tumor immuunrespons. De gecombineerde lokale toediening van CpG en GM-CSF versterkt dus de beschermende immuunrespons tegen melanoom via de gecoördineerde activatie van pDC en cDC subgroepen en de mobilisatie van BDCA3⁺ cDC subgroepen die met behulp van kruispresentatie T-cellen kunnen stimuleren.

Hoofdstuk 5 beschrijft de effecten van de lokale toediening van CpG en GM-CSF op zowel effector als regulatoire T en NK-cel subgroepen in de SWK van de melanoom patiënten uit hoofdstuk 4. Enerzijds worden effecten gezien die antitumor immuniteit ondersteunen zoals lagere CD4/CD8 ratios, Th1 'skewing', mogelijke rekrutering van effector NK cellen, en toegenomen hoeveelheden melanoom-specifieke CD8⁺ T-cellen. Anderzijds blijkt er tegengewicht te worden gegeven aan deze immunogene effecten door een toegenomen IL-10 productie

door T-cellen en significant hogere expressie levels van FoxP3 en CTLA4 in Tregs en een hiermee samengaannde toename van suppressieve activiteit van Tregs in de SWK. Een significant lager aantal SWK metastasen in de patiëntengroep die CpG en/of GM-CSF toegediend heeft gekregen in vergelijking met de placebo groep suggereert echter dat deze toename van suppressieve activiteit na CpG/GM toediening de immuun stimulerende eigenschappen niet overtreffen, maar dat manieren om deze suppressieve effecten te verminderen de effectiviteit van CpG en GM-CSF mogelijk nog zouden kunnen doen toenemen.

Om T-cellen uit kleine SWK monsters functioneel te kunnen testen is polyklonale T-cel expansie noodzakelijk. In de vergelijkende studie die beschreven wordt in Hoofdstuk 6 worden cellen uit de SWK van melanoom patiënten geëxpandeerd op de klassieke manier met anti-CD3/CD28 antilichamen en met het artificiële K32/4-1BBL APC systeem en wordt hun reactiviteit voor 'recall' en melanoom-specifieke antigenen getest. Onder de K32/4-1BBL-geëxpandeerde T-cellen bevonden zich significant meer effector/geheugen CD8⁺ T-cellen. Daarnaast werden 'recall' melanoom-specifieke antigenen vaker gedetecteerd in K32/4-1BBL-geëxpandeerde T-cellen in vergelijking met de anti-CD3/CD28 antilichaam-geëxpandeerde T-cellen. Het artificiële K32/4-1BBL APC systeem lijkt daarom beter geschikt voor de expansie van *in vivo* geprimeerde specifieke CD8⁺ T-cellen dan CD3/CD28 antilichamen en kan daarmee de monitoring van anti-tumor T-cel immuniteit in de SWK verbeteren.

Hoofdstuk 7 presenteert de lange termijn follow-up resultaten van het fase 2 onderzoek beschreven in hoofdstukken 4 en 5, gecombineerd met de follow-up resultaten van een voorgaande trial van onze groep waarbij enkel CpG lokaal geïnjecteerd werd bij vroeg stadium melanoom patiënten. Identieke inclusiecriteria en vergelijkbare immuunmodulatoire effecten van CpG in beide trials ondersteunden deze gecombineerde analyse. Na een klinische follow-up van 88.8 maanden (mediaan) observeerden we een duidelijk verbeterde ziektevrije overleving voor patiënten die behandeld waren met CpG/GM in vergelijking met de

controlegroep ($p=0.008$). Ook bij separate analyse van pathologische melanoom stadium 1 en 2 patiënten werd een significante verbetering van de ziektevrije overleving gezien in het voordeel van de patiënten die met CpG/GM behandeld waren. Deze gunstige klinische resultaten worden ondersteunt door gecombineerde analyses van de immuun monitoring data van beide studies. Deze bevestigden zowel de selectieve mobilisatie en activatie van $CD1a^-BDCA3^+$ cDC subgroepen met het vermogen tot kruispresentatie als de toename van melanoom-specifieke $CD8^+$ T-cellen in de SWK van CpG-behandelde melanoom patiënten. Aanvullend onderzoek van het perifere bloed van deze patiënten toonde bovendien dat melanoom-specifieke T-cellen ook in het perifere bloed waren toegenomen. Dit wijst op een systemische immunologische bescherming na lokale CpG injectie en is in overeenstemming met de geobserveerde en bijna-significante verbetering van ziektevrije overleving op afstand na lokale CpG/GM toediening.

Concluderend kunnen we stellen dat lokale, laag gedoseerde CpG injectie bij vroeg stadium melanoom patiënten een adjuvante therapeutische mogelijkheid biedt, die duurzame bescherming kan bieden aan een grote groep melanoom patiënten die momenteel, ondanks een reëel risico op ziekterecidief, geen adjuvante behandelopties hebben.

De studies in dit proefschrift worden verder bediscussieerd en geïntegreerd in Hoofdstuk 8 dat ook dient als een algemene discussie en vooruitzichten geeft op toekomstige ontwikkelingen. Daarnaast positioneert het onze bevindingen in de context van de ontwikkelingen binnen de immuuntherapie, waaronder recente bevindingen uit trials naar de (neo)adjuvante behandeling met immuun 'checkpoint' inhibitoren, en stelt het een mogelijke toekomstige behandelboom voor voor melanoom patiënten.